



大豆 GAPDH 家族基因生物信息学及其逆境组织表达分析

师立松,赵璇,付雅丽,李红雨,牛宁,李占军

(石家庄市农林科学研究院,河北石家庄 050041)

摘要:为探究大豆 GAPDH 家族基因应答非生物胁迫的机制,本研究采用同源分析、保守结构分析等方法对大豆 GAPDH 基因家族进行全基因组搜索,并对筛选出基因的系统发育关系、基因结构和保守基序、染色体分布、启动子区域的顺式作用元件进行分析,并研究了大豆 GAPDH 家族基因在不同组织中和非生物胁迫诱导后的表达模式。结果显示:在全基因组水平共搜索出 19 个大豆 GAPDH 家族成员,不均匀地分布在 10 条染色体上;亚细胞定位预测表明 16 个大豆 GAPDH 家族成员分布在叶绿体、细胞质和线粒体中;系统发育进化树将其分为 4 个亚家族 Sub I、Sub II、Sub III、Sub IV,且各个亚家族内基因的结构及保守基序具有高度保守性;基因启动子区域存在不同的与非生物胁迫响应和激素反应相关的顺式作用元件,推测其可能参与大豆非生物胁迫应答过程;大部分 GAPDH 基因在大豆不同组织中都有表达,并表现出明显的组织特异性;转录组分析发现分别有 5 和 9 个大豆 GAPDH 家族基因在干旱胁迫、盐胁迫下显著上调或者下调,其中 *GmGAPDH8* 和 *GmGAPDH9* 在干旱胁迫和盐胁迫下均显著上调表达。本研究对大豆 GAPDH 家族基因进行了系统分析,为进一步研究大豆的 GAPDH 家族基因在非生物胁迫应答过程中的调控作用提供理论基础。

关键词:大豆;GAPDH 家族基因;糖酵解;生物信息学分析;非生物胁迫;表达量

Bioinformatics and Tissue Expression Analysis of GAPDH Gene Family Under Abiotic Stress in Soybean

SHI Li-song, ZHAO Xuan, FU Ya-li, LI Hong-yu, NIU Ning, LI Zhan-jun

(Shijiazhuang Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050041, China)

Abstract: In order to explore the response mechanism of soybean GAPDH family genes under abiotic stress, we searched the whole genome of soybean GAPDH gene family by homology analysis and conservative structure analysis, and analyzed the phylogenetic relationship, gene structure and conservative motif, chromosome distribution and cis-acting elements of promoter region. We studied the expression patterns of soybean GAPDH family genes in different tissues and after abiotic stress induction. The results showed that 16 GAPDH family members were unevenly distributed on 10 chromosomes at the whole genome level. The subcellular localization prediction revealed that the 16 GAPDH genes of soybean distributed on chloroplasts, cytoplasm and mitochondria. The phylogenetic analysis showed that these GAPDH genes could be divided into four subfamilies (Sub I, Sub II, Sub III and Sub IV). Moreover, the gene structure and conserved motifs of each subfamily were highly conserved. Analysis of tissue expression patterns found that most GAPDH genes were expressed in different tissues, and showed obvious tissue specificity. Predictive analysis of promoter cis-acting elements found different homeopathic elements related to abiotic stress response and hormone response, which suggested that it may be involved in the abiotic stress response of soybean. In addition, transcriptome analysis found that, five and nine GAPDH family genes of soybean were significantly up-regulated or down-regulated respectively under drought stress and salt stress, *GmGAPDH8* and *GmGAPDH9* were significantly up-regulated under drought stress and salt stress. The systematic analysis of soybean GAPDH family genes provide a reference for further study of the regulatory role of soybean GAPDH family genes in abiotic stress response.

Keywords: Soybean; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Glycolysis; Bioinformatics; Abiotic stress; Amount of expression

收稿日期:2020-12-23

基金项目:河北省现代农业产业技术体系大豆产业创新团队建设项目(HBCT2019190402);河北省第二批青年拔尖人才支持计划;石家庄市科技局科学技术研究与发展计划(191490142A)。

第一作者:师立松(1996—),男,硕士,研究实习员,主要从事大豆遗传育种与分子生物学研究。E-mail:shilisongning@163.com。

通讯作者:李占军(1970—),男,硕士,研究员,主要从事大豆遗传育种与分子生物学研究。E-mail:nkylzhj@163.com;

牛宁(1980—),男,博士,副研究员,主要从事大豆遗传育种与分子生物学研究。E-mail:niuning1980@163.com。

3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)催化甘油醛-3-磷酸转化为1,3-二磷酸甘油酸酯,是糖酵解、糖原异生和卡尔文循环代谢过程中的关键酶,也是维持细胞生命活动最基本的酶之一^[1]。GAPDH几乎存在于所有生物体中。GAPDH基因曾被认为是一个简单的管家基因,并且被作为内参基因用于基因表达和蛋白质研究^[2]。在高等植物中,GAPDH蛋白可以分为磷酸化和非磷酸化两大类^[3]。磷酸化GAPDH主要可以分为3类:GAPA/B由*gapA*和*gapB*编码,主要在光合作用固定CO₂过程中参与叶绿体特异性磷酸化,催化1,3-二磷酸甘油酸(DPGA)生成磷酸丙糖^[4-6];GAPC由*gapC*编码,主要存在于细胞质中,催化细胞质中的甘油醛-3-P(Ga3P)转化为1,3-二磷酸甘油酸^[7-9];GAPCp由*gapcp*基因编码,催化细胞质中的甘油醛-3-P(Ga3P)转化为1,3-二磷酸甘油酸^[10-11]。此外,植物含有胞内非磷酸化的GAPDH(GAPN),属于乙醛脱氢酶超家族,与磷酸化GAPDH没有密切的功能和结构关系,催化Ga3P氧化成3-磷酸甘油酸酯(3PGA)^[12-13]。GAPDH蛋白的结构域在所有生物中都是高度保守的,主要由N端的NAD(P)结合域GP_dh_N结构域(PF00044)和C端的催化结构域GP_dh_C结构域(PF02800)组成。此外,一些GAPDH基因含有1个额外不完整的CP12结构域(PF02672)。非磷酸化的GAPDH(GAPN)包含Adledh结构域(PF00171)^[3]。

随着对植物GAPDH基因的深入研究,其非糖酵解功能在转录调控^[14-15]、信号转导^[16-17]和DNA修复^[18-19]过程中也已被证实,特别在生长发育和非生物胁迫反应途径中尤为突出。拟南芥质体GAPDH基因在根发育过程中参与平衡糖和氨基酸水平^[20];干扰质体GAPDH基因可能导致拟南芥雄性不育^[21];拟南芥质体GAPDH基因还参与脱落酸信号转导,影响种子萌发和植物生长^[22]。此外,植物GAPDH基因还参与胚胎发育^[23]、花粉发育等^[24]。在非生物胁迫应答过程中,GAPDH基因具有重要的调控作用。Takeda等^[25]发现GAPDH基因能促进拟南芥在低硒条件下生长。Zhang等^[26]通过过表达水稻中的*OsGAPC3*基因增强了水稻的耐盐性。在山杨中,GAPDH基因的表达量在干旱胁迫下呈增长趋势^[27]。*CsGAPDH3*和*CsGAPDH6*在甜橙种子萌发过程中缺磷条件下分别下调和上调^[28]。

大豆(*Glycine max* L.)是我国主要农作物之一,富含各类优质蛋白质、油脂、卵磷脂和异黄酮等多种营养物质^[29-30]。但是随着全球气候变暖,极端天气频率增高,大豆在生长过程中易受干旱、高盐与低温等非生物因素的胁迫,造成产量极大损失^[31]。因此,筛选抗逆基因对分子辅助培育优质大豆品种具有重要作用。许多大豆抗逆相关基因家族如WRKY^[32]、MYB^[33]、NAC^[34]和HD-Zip^[35]已经被鉴定和研究,而GAPDH基因家族在大豆的全基因组水平上还没有抗逆相关功能分析。

本研究利用两种blast方法检索大豆基因组中GAPDH家族成员;将拟南芥GAPDH家族基因(8个)和小麦GAPDH家族基因(16个)与大豆GAPDH家族基因进行多重序列比对,并构建系统进化树以进行系统分类以及进化分析;分析大豆GAPDH基因结构;绘制染色体定位图并分析大豆基因组中GAPDH基因的重复事件;预测启动子区域顺式作用元件;分析GAPDH基因在大豆不同组织中的表达模式;根据GEO数据库中大豆响应干旱胁迫和盐胁迫的转录组数据分析大豆GAPDH家族基因在非生物胁迫下的表达量。本研究对大豆GAPDH基因家族进行全面系统研究,以期为大豆抗逆育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 大豆GAPDH基因的全基因组搜索

利用NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)网站的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、小麦(*Triticum aestivum*)GAPDH基因序列以及Ensembl Plants(<http://plants.ensembl.org/index.html>)数据库中大豆(Williams 82)基因组序列,查找大豆基因组中GADPH的同源序列。下载Pfam数据库(<https://pfam.xfam.org/>)中GADPH基因家族保守结构域的隐马尔科夫模型文件:PF00044(Gp_dh_N结构域)、PF02800(Gp_dh_C结构域)、PF02672(CP12结构域)以及PF00171(Aldedh),利用HMMER3.0软件在大豆全基因组水平上进行搜索^[36],合并搜索结果作为候选基因。利用SMART在线软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和NCBI的CDD数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/index.shtml>)验证是否存在Gp_dh_N和Gp_dh_C保守结构域,去除冗余序列以及不完整序列,最终确认大豆GAPDH家族基因。

1.2 理化性质分析及亚细胞定位预测

利用 ExPASy (<http://expasy.org/>) 在线软件对获得的大豆 GAPDH 家族蛋白序列进行氨基酸数、分子量、理论等电点以及脂肪族氨基酸数等基本理化性质进行分析预测。利用 Plant-mPLOC (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 在线软件进行蛋白亚细胞定位预测分析;利用 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 在线软件进行蛋白亲/疏水性预测分析。

1.3 系统进化分析

使用 Clustal X 软件^[37]对拟南芥、小麦和大豆的 GAPDH 蛋白序列进行多重序列比对。根据序列比对结果,利用 MEGA5.2 软件^[38]的相邻连接法(Neighbor - Joining)构建系统进化树,Bootstrap 值(校验参数)设置为 1 000 次。利用 Evolview (<https://www.evolgenius.info/evolview/#login>) 在线软件完善系统进化树。

1.4 基因结构及保守结构域分析

通过在线软件 MEME (<http://meme.nbcr.net/meme/>) 分析大豆 GAPDH 基因的 CDS 序列,获得基因外显子、内含子结构,鉴定保守基序,设定基序最大数目为 15,基序长度设为 6 ~ 50 个氨基酸;利用在线软件 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 进行结构域分析,最后根据大豆基因组的 GFF3 文件,使用 TBtools 软件绘制基因结构图^[39]。

1.5 染色体定位及基因复制

根据 GAPDH 家族基因在大豆基因组上的物理位置,利用 TBtools 软件绘制基因染色体定位图。利用 TBtools 软件的 MCSanX 功能鉴定大豆 GAPDH 家族基因的串联重复和片段重复并进行可视化^[39]。

1.6 顺式作用元件预测

提取大豆基因组中已搜索到的 GAPDH 基因上游 2 000 bp 的序列,提交到 PlantCare 网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 预测启动子区域的顺式元件。利用 TBtools 软件绘制大豆 GAPDH 基因顺式作用元件示意图^[39]。

1.7 基因表达分析

获取 Phytozome 数据库 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>) 中大豆根、根毛、根瘤、茎、茎尖、叶、花、种子和荚等组织中 GAPDH 的表达量,搜索并分析大豆 GAPDH 家族基因在各组织中的表达模式。获取 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>) 中大豆应答盐胁迫与干旱胁迫

(GSE57252) 的转录组数据,搜索并分析大豆 GAPDH 家族基因在盐胁迫和干旱胁迫下大豆叶片中的表达量。利用 TBtools 软件绘制大豆 GAPDH 基因在各组织中的表达量和非生物胁迫下的表达量热图。

2 结果与分析

2.1 大豆 GAPDH 家族成员理化性质分析及亚细胞定位预测

经检索分析,共筛选出 19 个 GAPDH 基因和 3 个 GAPN 基因。根据大豆 GAPDH 家族基因所在染色体顺序及基因编号,将其命名为 *GmGAPDH1* ~ *GmGAPDH16*、*GmGAPN1* ~ *GmGAPN3*。

大豆 GAPDH 家族基因的理化性质分析结果显示,16 个 GAPDH 蛋白序列长度为 261 ~ 452 aa,其中 *GmGAPDH9* 蛋白序列最长(452 aa),*GmGAPDH11* 蛋白序列最短(261 aa);相对分子量为 28 218.53 ~ 48 304.07 Da,其中 *GmGAPDH9* 相对分子量最大(48 304.07 Da),而 *GmGAPDH11* 相对分子量最小(28 218.53 Da);此外理论等电点为 6.54(*GmGAPDH16*) ~ 8.83(*GmGAPDH12*),不稳定系数为 18.82(*GmGAPDH11*) ~ 34.26(*GmGAPDH2*),脂肪系数为 84.99(*GmGAPDH16*) ~ 107.05(*GmGAPDH11*)。*GmGAPDH11*、*GmGAPN1* 和 *GmGAPN3* 为疏水性蛋白,其余均为亲水性蛋白(表 1)。

亚细胞定位显示,*GmGAPDH1*、*GmGAPDH5* 和 *GmGAPDH12* 基因定位于叶绿体,*GmGAPDH6/7* 定位于细胞质,除此之外的大部分 GAPDH 基因定位于线粒体;*GmGAPN1/2/3* 则全部定位于细胞质。大豆 GAPDH 存在 3 种亚细胞定位位置,暗示其具有不同的功能(表 1)。

2.2 系统进化分析

聚类结果如图 1 所示,可以将 GAPDH 家族基因分为 4 大亚家族,分别为 Sub I、Sub II、Sub III 和 Sub IV。系统发育分析表明,该进化树分类与拟南芥、小麦自身的进化树结果一致,说明该进化树的可靠性。Sub I 亚家族代表 *GAPA/B* 基因,包含 6 个大豆 GAPDH 家族基因,分别为 *GmGAPDH1/5/9/11/13/15*,其中 *GmGAPDH5/9* 与拟南芥 *AtGAPB* 在进化上关系较近;Sub II 亚家族代表 *GAPCp* 基因,仅包含 *GmGAPDH2* 和 *GmGAPDH12* 两个家族成员,均与拟南芥 *AtGAPCp1/2* 在进化上关系较近;Sub III 亚家族代表 *GAPC* 基因,包含 8 个大豆 GAPDH 家族基因,分别为 *GmGAPDH3/4/6/7/8/10/14/16*,它

们包含的数量最多,占大豆 GAPDH 家族成员的 50%,其中 *GmGAPDH6/16* 与小麦 *TaGAPDH10/12* 进化关系较近;Sub IV 亚家族代表 GAPN 基因,

GmGAPN1 ~ GmGAPN3 全部属于该亚家族,其中 *GmGAPN2* 与拟南芥 *GAPN* 进化距离较近,因此推测两个基因之间具有相似功能。

表 1 大豆 GAPDH 家族成员的基本信息

Table 1 The basic information of GAPDH gene family members in soybean

基因名称 Gene name	基因序列号 Gene ID	氨基酸数目 Number of amino acid/aa	分子量 Molecular weight/Da	理论等电点 Theoretical pI	不稳定系数 Instability index	脂肪系数 Aliphatic index	亲/疏水性 Hydrophilicity/ Hydrophobicity	亚细胞定位 Subcellular location
<i>GmGAPDH1</i>	Glyma02G068800	276	29254. 89	7. 81	27. 97	86. 56	亲水性	叶绿体
<i>GmGAPDH2</i>	Glyma03G092700	418	44655. 89	8. 71	34. 26	86. 08	亲水性	线粒体
<i>GmGAPDH3</i>	Glyma04G193500	338	36841. 16	7. 10	22. 62	89. 64	亲水性	线粒体
<i>GmGAPDH4</i>	Glyma04G193400	338	36841. 16	7. 10	22. 62	89. 64	亲水性	线粒体
<i>GmGAPDH5</i>	Glyma04G015900	451	48173. 97	7. 10	25. 85	90. 55	亲水性	叶绿体
<i>GmGAPDH6</i>	Glyma05G073100	337	36405. 72	8. 18	25. 91	87. 30	亲水性	细胞质
<i>GmGAPDH7</i>	Glyma06G172700	338	36737. 00	6. 72	20. 57	91. 09	亲水性	细胞质
<i>GmGAPDH8</i>	Glyma06G172600	338	36764. 07	6. 72	22. 56	91. 39	亲水性	线粒体
<i>GmGAPDH9</i>	Glyma06G015900	452	48304. 07	6. 76	25. 84	89. 49	亲水性	线粒体
<i>GmGAPDH10</i>	Glyma11G247600	340	37014. 33	6. 98	23. 04	89. 41	亲水性	线粒体
<i>GmGAPDH11</i>	Glyma16G150200	261	28218. 53	7. 75	18. 82	107. 05	疏水性	线粒体
<i>GmGAPDH12</i>	Glyma16G081400	418	44810. 19	8. 83	34. 09	87. 94	亲水性	叶绿体
<i>GmGAPDH13</i>	Glyma16G044900	403	43202. 24	7. 61	30. 97	92. 13	亲水性	线粒体
<i>GmGAPDH14</i>	Glyma18G009700	338	36838. 15	6. 97	22. 67	90. 77	亲水性	线粒体
<i>GmGAPDH15</i>	Glyma19G106800	403	43187. 27	8. 42	29. 74	91. 89	亲水性	线粒体
<i>GmGAPDH16</i>	Glyma19G078300	337	36405. 57	6. 54	24. 26	84. 99	亲水性	线粒体
<i>GmGAPN1</i>	Glyma02G202500	497	53251. 74	6. 76	33. 69	93. 40	疏水性	细胞质
<i>GmGAPN2</i>	Glyma17G218200	496	53194. 62	7. 54	35. 91	91. 63	亲水性	细胞质
<i>GmGAPN3</i>	Glyma17G075300	497	53159. 63	6. 76	34. 14	94. 00	疏水性	细胞质

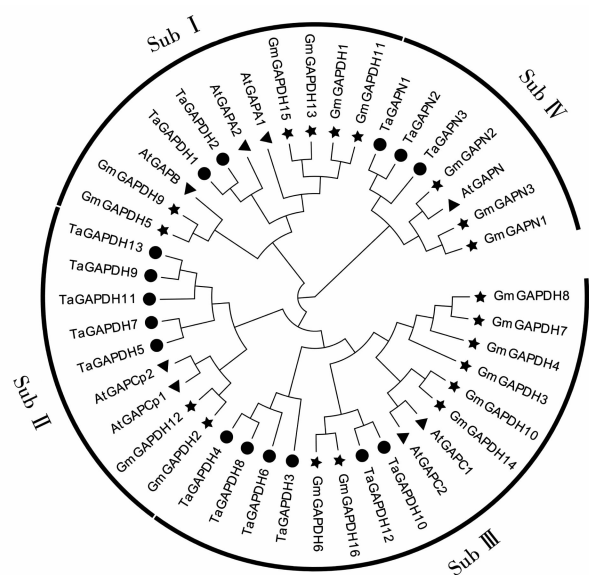


图 1 大豆和拟南芥及小麦 GAPDH 基因家族系统进化树

Fig. 1 The phylogenetic tree of GAPDH gene family in soybean, *Arabidopsis thaliana* and wheat

2.3 大豆 GAPDH 家族基因结构及保守基序分析

基因结构分析结果显示,大豆 GAPDH 基因含有保守的基因结构,外显子的数量、顺序和长度在各 GAPDH 亚家族中几乎是保守的,而内含子和 UTR 显示出不同的长度和分布。在大豆中,同一亚家族的 GAPDH 基因具有相似的外显子/内含子结构,而在不同的亚家族之间各成员的外显子/内含子结构存在一定的差异(图 2)。

大豆 GAPDH 蛋白序列的保守基序分析结果显示,共鉴定到 15 个保守基序,不同亚家族之间的大豆 GAPDH 基因的保守基序种类、数目存在差异。Sub I、Sub II 和 Sub IV 3 个亚家族内 GAPDH 家族成员的保守基序的种类、数目和位置具有高度保守性,而 Sub III 亚家族内 GAPDH 家族成员的保守基序有一定差异,进一步说明基因家族成员间保守基序保守性与基因家族成员之间的进化有密切关系。大豆 GAPDH 基因家族蛋白均含有 5 ~ 10 个基序,

其中, *GAPDH1/11* 中基序数目最少(5 个), *GAPDH13/15* 中基序数目最多(10 个)。Sub IV 亚家族与其他家族之间的保守基序有较大差异, 包含

adledh 结构域, 不包含 gp_dh_n 和 gp_dh_c 结构域, 而其他 3 个亚家族不包含 adledh 结构域(图 2)。



图 2 大豆 GAPDH 家族基因结构及保守基序

Fig. 2 The gene structures and conserved motifs of GAPDH gene family in soybean

2.4 大豆 GAPDH 家族基因染色体定位及共线性分析

绘制的染色体定位图显示,19 个 GAPDH 基因不均匀地分布于大豆的 10 条染色体 (chr2、chr3、chr4、chr5、chr6、chr11、chr16、chr17、chr18 和 chr19)。在 chr3、chr5、chr11 和 chr18 染色体上只包含 1 个 GAPDH 基因;chr2、chr17 和 chr19 染色体上各包含 2 个 GAPDH 基因,其中 chr17 染色体上的两

个基因属于 Sub IV 亚家族;chr4、chr6 和 chr16 染色体上各包含 3 个 GAPDH 基因(图 3)。

大豆基因组中 GAPDH 基因重复事件的分析结果显示,大豆基因组中 GAPDH 基因中没有串联重复基因对,但有 8 对片段重复(图 4)。推测一些 GAPDH 基因由基因复制事件产生,基因复制事件在新功能的产生和基因扩增中起着不可或缺的作用,可能是大豆 GAPDH 基因进化的主要驱动力。

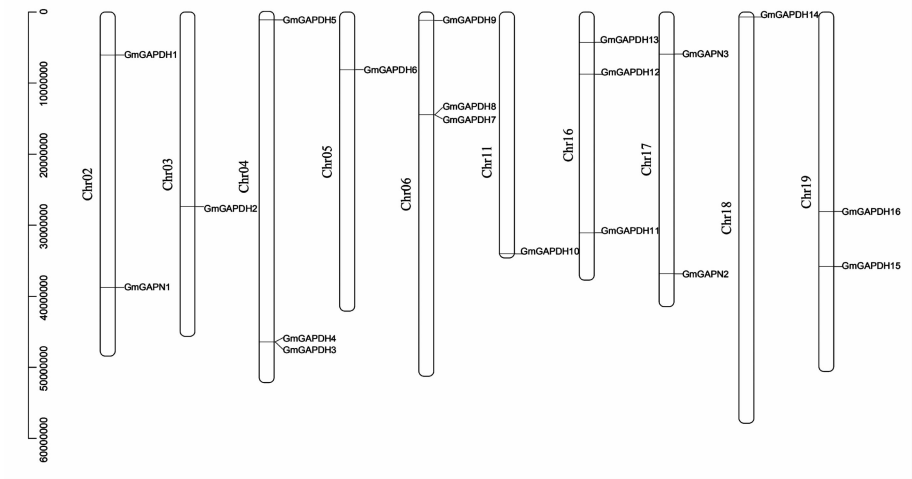


图 3 大豆 GAPDH 基因家族的染色体定位

Fig. 3 The chromosomal locations of the GAPDH gene family in soybean

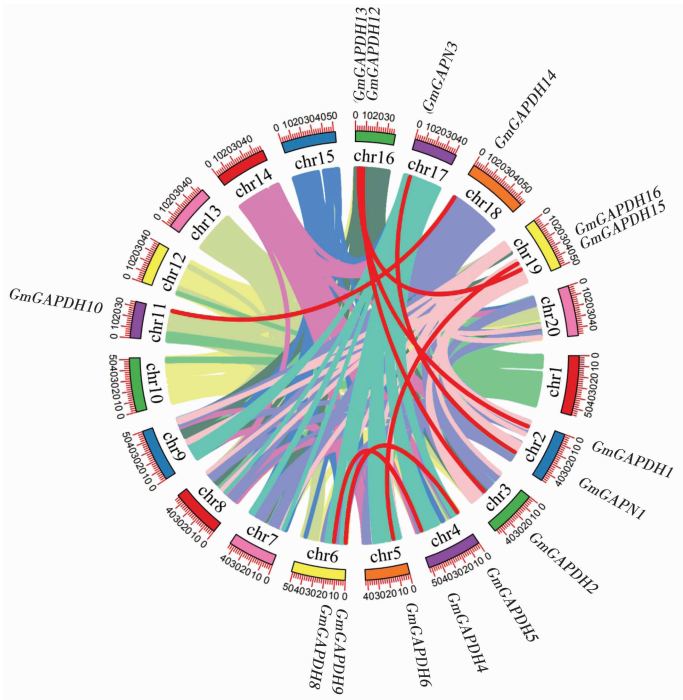


图4 大豆 GAPDH 基因家族共线性分析

Fig. 4 The collinear analysis of the GAPDH gene family in soybean

2.5 大豆 GAPDH 基因启动子顺式作用元件预测分析

大豆 GAPDH 基因上游2 000 bp启动子区域顺式作用元件预测结果如图 5 所示,共预测出 16 种顺式作用元件,这些顺式作用元件主要涉及光响应、生长素响应、赤霉素响应、脱落酸响应、MeJA 响应、

防御和应力响应、低温响应、干旱诱导性和厌氧感应等,其中光响应作用元件最丰富。植物激素响应及非生物胁迫响应相关的顺式作用元件在植物非生物胁迫应答反应中起着重要作用,表明大豆 GAPDH 基因可能参与不同非生物胁迫防御反应和调节各种生命过程。

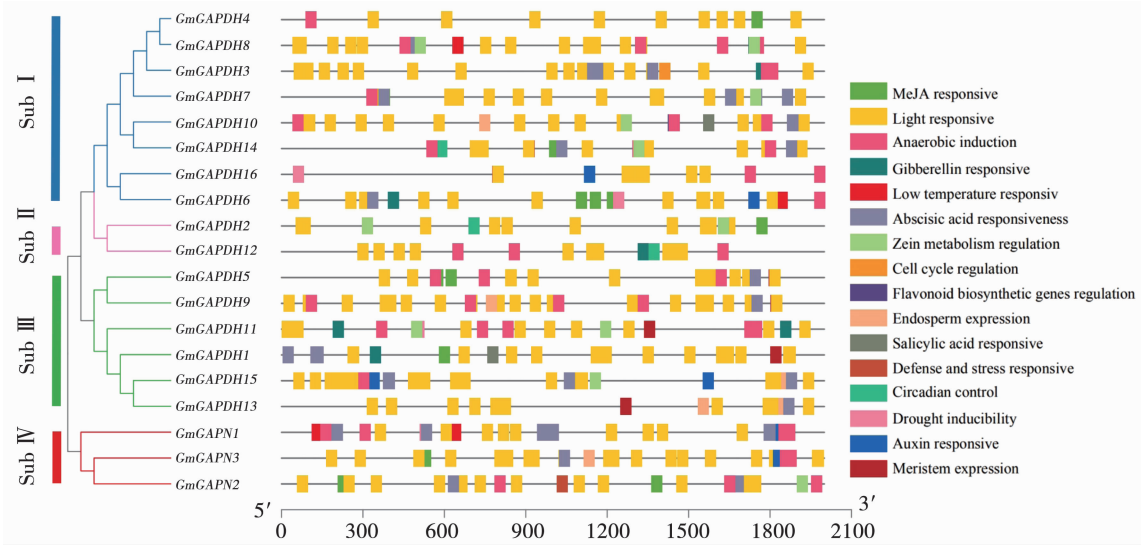


图5 大豆 GAPDH 基因启动子顺式作用元件预测分析

Fig. 5 The prediction and analysis of cis-acting elements among the GAPDH gene promoter regions in soybean

2.6 大豆 GAPDH 基因的组织表达模式

大豆 GAPDH 基因在根、根毛、根瘤、茎、茎顶端、花、叶、荚和种子等不同组织中的表达模式分析

结果如图 6 所示,大部分 GAPDH 基因在大豆不同组织中均有表达,并表现出明显的组织特异性。*GmGAPDH2* 和 *GmGAPDH12*、*GmGAPDH5* 和 *GmGAPDH9*、

GmGAPDH13 和 *GmGAPDH15* 具有相似的表达模式。*GmGAPDH3*、*GmGAPDH4*、*GmGAPDH7* 和 *GmGAPDH8* 在大豆各组织中的表达量均较高,说明这些基因在各

个组织均可能发挥作用。而 *GmGAPDH1*、*GmGAPDH2*、*GmGAPDH6*、*GmGAPDH11* 和 *GmGAPDH16* 在大豆各个组织中表达量均较低。此外,一些大豆 GAPDH 基因具有组织特异性表达规律,*GmGAPDH2* 和 *GmGAPDH12* 在根和根瘤中的表达量较高,而在叶中的表达量较低。*GmGAPDH5* 和 *GmGAPDH9* 在叶中的表达量较高,而在根瘤中的表达量较低。

2.7 大豆 GAPDH 家族基因非生物胁迫响应分析

大豆 GAPDH 家族基因在不同非生物胁迫下的表达量结果如图 7 所示,大部分 GAPDH 基因在干旱胁迫和盐胁迫下具有相似的表达模式。在干旱胁迫下,*GmGAPDH8* 和 *GmGAPDH9* 表达量显著上调,而 *GmGAPDH7*、*GmGAPDH13* 和 *GmGAPDH16* 表达量显著下调。干旱胁迫 1 h, *GmGAPDH1*、*GmGAPDH8*、*GmGAPDH9* 和 *GmGAPN3* 表达量显著上调,*GmGAPDH13*、*GmGAPDH14* 和 *GmGAPDH16* 表达量显著下调。在盐胁迫下, *GmGAPDH1*、*GmGAPDH8*、*GmGAPDH9* 和 *GmGAPN3* 表达量显著上调,而 *GmGAPDH5*、*GmGAPDH7*、*GmGAPDH13*、*GmGAPDH14*、*GmGAPDH16* 表达量显著下调。结果表明 *GmGAPDH8* 和 *GmGAPDH9* 在干旱胁迫和盐胁迫下均显著上调表达,因此推测 *GmGAPDH8* 和 *GmGAPDH9* 可能在大豆非生物胁迫反应中发挥作用。

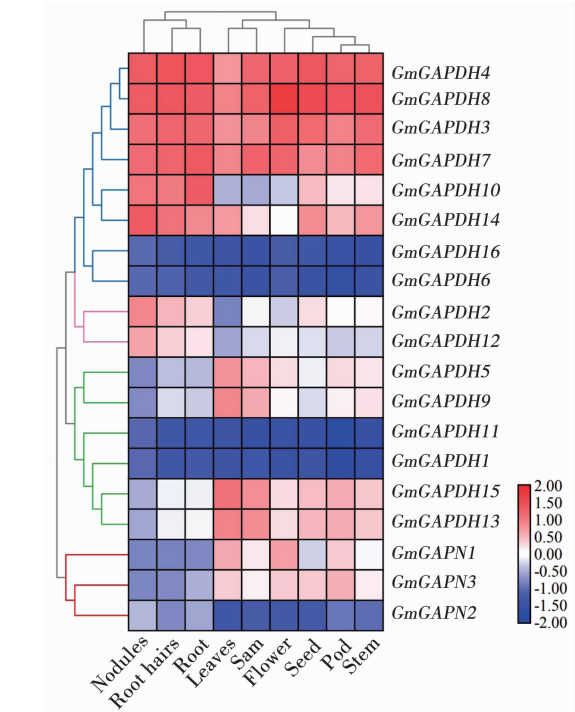


图 6 大豆 GAPDH 基因在不同组织中的表达模式
Fig. 6 The expression pattern of GAPDH genes in different soybean tissues

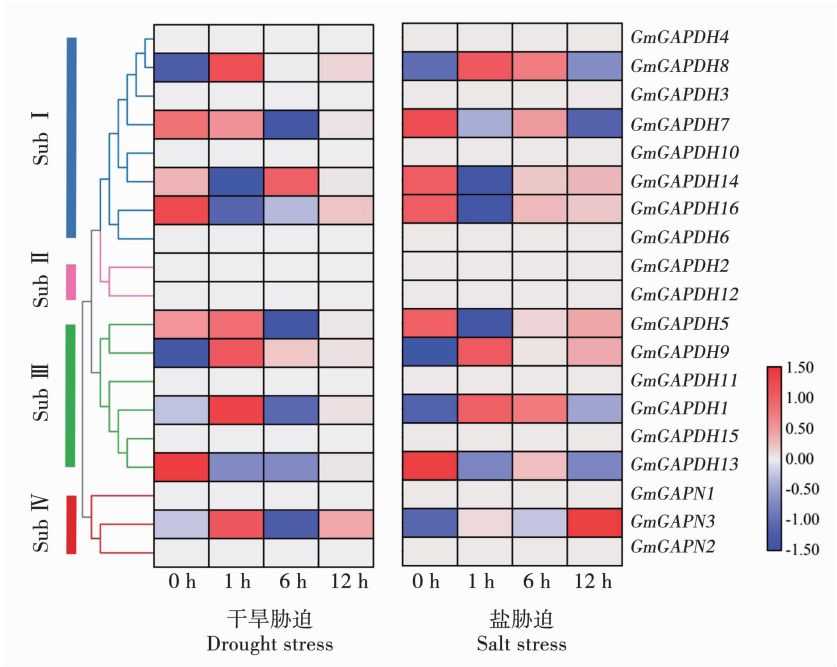


图 7 大豆 GAPDH 家族基因在干旱胁迫和盐胁迫下表达分析
Fig. 7 The expression analysis of GAPDH genes in soybean under drought stress and salt stress

3 讨论

磷酸甘油醛脱氢酶是糖酵解、糖原异生和卡尔文循环代谢过程中的关键酶之一,广泛存在于生物体细胞内且高度表达。近年来,随着全基因组测序技术的迅速发展,一些物种中 GAPDH 家族成员的全基因组鉴定已初步完成,然而对大豆 GAPDH 基因家族的相关研究鲜有报道,特别是对各种非生物胁迫响应的信息仍然有限。本研究从大豆基因组中鉴定得到 19 个 GAPDH 家族基因,少于小麦中 GAPDH 家族基因的数量(22 个)^[40],而多于拟南芥中 GAPDH 家族基因的数量(8 个)^[10],不均匀地分布在大豆的 10 条染色体上。大豆是一种古老的多倍体作物,具有高度重复的基因组,大约 75% 基因存在于多个拷贝中^[29],通过对大豆基因组复制事件分析,发现 8 对片段重复基因,但是未发现串联重复基因,推测这些复制事件是大豆家族基因扩展的主要驱动力,同时也可能是导致大豆 GAPDH 基因数量多于拟南芥,而少于小麦的原因。

亚细胞定位预测发现,大豆 GAPDH 家族的 19 个基因定位到叶绿体、线粒体、细胞质中,表明其编码不同的磷酸甘油醛脱氢酶,参与不同的代谢途径。通过分析系统进化树发现,大豆 GAPDH 家族基因可以分为 Sub I (GAPA/B)、Sub II (GAPCp)、Sub III (GAPC)以及 Sub IV (GAPN)等 4 个亚家族,与拟南芥、小麦等作物中 GAPDH 基因系统进化分类一致,因此推测大豆可能与拟南芥、小麦等具有相似的进化轨迹。基因结构及保守基序分析发现大豆 GAPDH 家族基因各个亚家族内在进化中相对保守,而在不同亚家族之间存在差异,GAPDH 成员之间结构的一致性和差异可以直接或间接地说明它们的功能上的相似性和差异。

基因启动子区域内顺式作用元件的种类和数量能侧面表明其相关功能^[41],本研究通过对启动子区域内的顺势作用元件预测发现 GAPDH 家族成员包含 16 种顺式作用元件,不同亚家族成员含有元件种类和数量不同,其中光反应元件数量最多。*GmGAPDH1*、*GmGAPDH5* 和 *GmGAPDH12* 基因定位于叶绿体,且启动子区域包含多种光反应作用元件,进一步说明这 3 个基因可能在光合作用固定 CO₂过程中参与叶绿体特异性磷酸化,催化 1,3 - 二磷酸甘油酸 (DPGA) 生成磷酸丙糖,参与卡尔文循

环。此外还预测到生长素响应、赤霉素响应、脱落酸响应、MeJA 响应、防御和应力响应、低温响应、干旱诱导性和厌氧感应等顺式作用元件。大豆 GAPDH 家族成员包含不同的非生物胁迫响应的顺式作用元件,同时包含激素反应相关的作用元件,说明 GAPDH 基因除了在植物代谢过程中发挥作用,可能还参与不同非生物胁迫防御反应和调节一些生物过程。前人研究发现,在拟南芥中,GAPCs 通过与磷脂酶 D (PLD δ) 相互作用来传递过氧化氢信号,GAPC-PLD δ 相互作用介导了拟南芥对 ABA 和水分亏缺的反应^[42];玉米基因 *GAPC3* 和 *GAPC4* 被厌氧胁迫诱导^[43];过表达水稻细胞质基因 *OsGAPC3* 能增强水稻的耐盐性^[26]。本研究通过分析大豆非生物胁迫诱导表达,发现大豆分别有 5 和 9 个 GAPDH 家族基因在干旱胁迫、盐胁迫下显著上调或者下调,其中 *GmGAPDH8* 和 *GmGAPDH9* 在干旱胁迫和盐胁迫下均显著上调表达,因此推测 *GmGAPDH8* 和 *GmGAPDH9* 积极参与了大豆非生物胁迫的应答。

4 结论

本研究基于大豆全基因组数据,在大豆中共搜索出 19 个 GAPDH 家族成员,不均匀地分布在 10 条染色体上,并将其命名为 *GmGAPDH1* ~ *GmGAPDH16*、*GmGAPN1* ~ *GmGAPN3*。大豆、拟南芥和小麦 GAPDH 家族基因的系统发育进化树将其分为 Sub I、Sub II、Sub III 和 Sub IV 4 个亚家族,且各个亚家族内基因的结构及保守基序具有高度保守性。大豆 GAPDH 基因家族启动子区域具有丰富的光响应元件和激素类响应元件,表明 GAPDH 基因家族可能是光调节反应和非生物胁迫应答过程的重要因子。大部分大豆 GAPDH 基因在不同组织中都有表达,并表现出明显的组织特异性。分别有 5 和 9 个大豆 GAPDH 家族基因在干旱胁迫、盐胁迫下显著上调或者下调,其中 *GmGAPDH8* 和 *GmGAPDH9* 在干旱胁迫和盐胁迫下均显著上调表达,因此大豆 GAPDH 家族基因除了参与糖酵解过程,还可能在大豆抵抗非生物胁迫中发挥作用。本研究为大豆分子育种提供了重要的候选基因和理论基础,后续研究将进一步探索大豆 GAPDH 家族基因的抗逆相关功能及分子机制。

参考文献

- [1] Sirover M A. On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Biochemical mechanisms and regulatory control[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, 1810(8): 741-751.
- [2] Nicholls C, Li H, Liu J P. GAPDH: A common enzyme with uncommon functions [J]. *Clinical Experimental Pharmacology Physiology*, 2012, 39(8): 674-679.
- [3] Zeng L F, Deng R, Guo Z, et al. Genome-wide identification and characterization of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes family in wheat (*Triticum aestivum*) [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 240.
- [4] Tristan C, Shahani N, Sedlak T W, et al. The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments [J]. *Cellular Signaling*, 2011, 23(2): 317-323.
- [5] Marri L, Sparla F, Pupillo P, et al. Co-ordinated gene expression of photosynthetic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoribulokinase, and CP12 in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 56(409): 73-80.
- [6] Howard T P, Lloyd J C, Raines C A. Inter-species variation in the oligomeric states of the higher plant calvin cycle enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and phosphoribulokinase [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(11): 3799-3805.
- [7] Petersen J, Brinkmann H, Rüdiger C. Origin, evolution, and metabolic role of a novel glycolytic GAPDH enzyme recruited by land plant plastids[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2003, 57(1): 16.
- [8] Wang Q, Kuo L, Sjlund R, et al. Immunolocalization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Protoplasma*, 1997, 198(3-4): 155-162.
- [9] Anoman A D, Muñoz B J, Rosa T S, et al. Plastidial glycolytic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is an important determinant in the carbon and nitrogen metabolism of heterotrophic cells in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(3): 1619-1637.
- [10] Vescovi M, Zaffagnini M, Festa M, et al. Nuclear accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cadmium-stressed *Arabidopsis* roots[J]. *Plant Physiology*, 2013, 162(1): 333-346.
- [11] Mirko Z, Simona F, Alex C, et al. Plant cytoplasmic GAPDH: Redox post-translational modifications and moonlighting properties [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 450.
- [12] Bustos D M, Bustamante C A, Iglesias A A. Involvement of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in response to oxidative stress [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2008, 165(4): 456-461.
- [13] Valverde F, Ortega J M, Losada M, et al. Sugar-mediated transcriptional regulation of the *Gap* gene system and concerted photosystem II functional modulation in the microalga *Scenedesmus vacuolatus* [J]. *Planta*, 2005, 221(6): 937-952.
- [14] Zhang H, Zhao Y, Zhou D X. Rice NAD⁺-dependent histone deacetylase *OsSRT1* represses glycolysis and regulates the moonlighting function of GAPDH as a transcriptional activator of glycolytic genes [J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(21): 12241.
- [15] Garcin E D. GAPDH as a model non-canonical AU-rich RNA binding protein[J]. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2018, 86: 162-173.
- [16] Zheng L, Roeder R G, Luo Y. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component[J]. *Cell*, 2003, 114(2): 255-266.
- [17] Colell A, Ricci J E, Tait S, et al. GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation[J]. *Cell*, 2007, 129(5): 983-997.
- [18] Ferreira E, Giménez R, Cañas M A, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is required for efficient repair of cytotoxic DNA lesions in *Escherichia coli* [J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2015, 60: 202-212.
- [19] Kosova A A, Khodyreva S N, Lavrik O I. Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in DNA repair [J]. *Biochemistry*, 2017, 82(6): 643-654.
- [20] Muñoz-Bertomeu J, Cascales-Miñana B, Mulet J M, et al. Plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase deficiency leads to altered root development and affects the sugar and amino acid balance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2009, 151(2): 541-558.
- [21] Muñoz-Bertomeu J, Cascales-Miñana B, Irlés-Segura A, et al. The plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is critical for viable pollen development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2010, 152(4): 1830-1841.
- [22] Muñoz-Bertomeu J, Bermúdez M A, Segura J, et al. *Arabidopsis* plants deficient in plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase show alterations in abscisic acid (ABA) signal transduction: Interaction between ABA and primary metabolism [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(3): 1229-1239.
- [23] Rius S P, Casati P, Iglesias A A, et al. Characterization of an *Arabidopsis thaliana* mutant lacking a cytosolic non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 61(6): 945-957.
- [24] Rius S P, Casati P, Iglesias A A, et al. Characterization of *Arabidopsis* lines deficient in GAPC-I, a cytosolic NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [J]. *Plant Physiology*, 2008, 148(3): 1655-1667.
- [25] Takeda T, Fukui Y. Possible role of NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in growth promotion of *Arabidopsis* seedlings by low levels of selenium [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2015, 79(10): 1579-1586.
- [26] Zhang X H, Rao X L, Shi H T, et al. Overexpression of a

cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene *OsGAPC3* confers salt tolerance in rice[J]. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 2011, 107(1): 1-11.

[27] Pelah D, Shoseyov O, Altman A, et al. Water-stress response in aspen (*Populus tremula*): Differential accumulation of dehydrin, sucrose synthase, GAPDH homologues, and soluble sugars[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1997, 151(1): 96-100.

[28] Miao L K, Chen C L, Yao L, et al. Genome-wide identification, characterization, interaction network and expression profile of GAPDH gene family in sweet orange (*Citrus sinensis*) [J]. *Peer J*, 2019, 7(3): e7934.

[29] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, et al. Erratum: Genome sequence of the palaeopolyploid soybean[J]. *Nature*, 2010, 465(7278): 178-183.

[30] 姜海鹏, 田力峥, 卜凡珊, 等. 大豆胞囊线虫病抗性相关 bZIP 转录因子的生物信息学分析[J]. *大豆科学*, 2020, 39(5): 703-711. (Jiang H P, Tian L Z, Bu F S, et al. Bioinformatics analysis of bZIP transcription factors related to resistance to soybean cyst nematode [J]. *Soybean Science*, 2020, 39(5): 703-711.)

[31] 林延慧, 唐力琼, 徐靖, 等. 大豆响应涝害 bZIP 基因 *Glyma04g04170* 的生物信息学分析及互作蛋白预测[J]. *大豆科学*, 2020, 39(5): 727-733. (Lin Y H, Tang L Q, Xu J, et al. Bioinformatics analysis and interacting protein prediction of soybean bZIP gene *Glyma04g04170* in response to submergence stress[J]. *Soybean Science*, 2020, 39(5): 727-733.)

[32] Yu Y C, Wang N, Hu R B, et al. Genome-wide identification of soybean WRKY transcription factors in response to salt stress[J]. *Springerplus*, 2016, 5(1): 920.

[33] Du H , Yang S S , Liang Z, et al. Genome-wide analysis of the MYB transcription factor superfamily in soybean[J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12(1):106.

[34] Tien L D, Rie N, Yasuko W, et al. Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress[J]. *DNA Research an International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes & Genomes*, 2011, 18(4): 263-276.

[35] Chen X, Chen Z, Zhao H L, et al. Genome-wide analysis of soybean HD-Zip gene family and expression profiling under salinity and drought treatments[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e87156.

[36] Finn R D, Coghill P, Eberhardt R Y, et al. The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(D1): D279-D285.

[37] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947-2948.

[38] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7. 0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.

[39] Chen C J, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.

[40] Zeng L F, Deng R, Guo Z P, et al. Genome-wide identification and characterization of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes family in wheat (*Triticum aestivum*) [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17: 240.

[41] Tong J F, Walk T C, Han P P, et al. Genome-wide identification and analysis of high-affinity nitrate transporter 2 (NRT2) family genes in rapeseed (*Brassica napus* L.) and their responses to various stresses[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 464.

[42] Guo L, Devaiah S P, Narasimhan R, et al. Cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases interact with phospholipase D to transduce hydrogen peroxide signals in the *Arabidopsis* response to stress [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(5): 2200-2212.

[43] Manjunath S, Sachs M M. Molecular characterization and promoter analysis of the maize cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene family and its expression during anoxia[J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 33(1): 97-112.